

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 3月19日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-078930

[ ST.10/C ]:

[ JP 2001-078930 ]

出 願 人

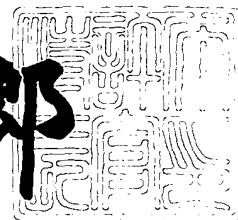
Applicant(s):

味の素株式会社

2003年 5月27日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3040032

【書類名】 特許願

【整理番号】 Y1I0188

【提出日】 平成13年 3月19日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社  
食品研究所内

【氏名】 鯉渕 恭子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社  
食品研究所内

【氏名】 二宮 大記

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社  
食品研究所内

【氏名】 小島 麻里

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社  
食品研究所内

【氏名】 上田 要一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県牛久市上柏田 3 - 4 4 - 1 8

【氏名】 北本 勝ひこ

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100059959

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 稔

【選任した代理人】

【識別番号】 100067013

【弁理士】

【氏名又は名称】 大塚 文昭

【選任した代理人】

【識別番号】 100082005

【弁理士】

【氏名又は名称】 熊倉 禎男

【選任した代理人】

【識別番号】 100065189

【弁理士】

【氏名又は名称】 穴戸 嘉一

【選任した代理人】

【識別番号】 100096194

【弁理士】

【氏名又は名称】 竹内 英人

【選任した代理人】

【識別番号】 100074228

【弁理士】

【氏名又は名称】 今城 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100084009

【弁理士】

【氏名又は名称】 小川 信夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100082821

【弁理士】

【氏名又は名称】 村社 厚夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100086771

【弁理士】

【氏名又は名称】 西島 孝喜

【選任した代理人】

【識別番号】 100084663

【弁理士】

【氏名又は名称】 箱田 篤

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008604

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規アミノペプチダーゼおよびその遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記 (A) ～ (D) のいずれかに示すタンパク質。

(A) 配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 1 ～ 519 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 4 のアミノ酸番号 1 ～ 510 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

(C) 配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 1 ～ 519 で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ペプチドの N-末端からアミノ酸を遊離する反応を触媒する活性を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号 4 のアミノ酸番号 1 ～ 510 で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ペプチドの N-末端からアミノ酸を遊離する反応を触媒する活性を有するタンパク質。

【請求項 2】 下記 (A) ～ (D) のいずれかに示すタンパク質をコードする核酸分子。

(A) 配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 1 ～ 519 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 4 のアミノ酸番号 1 ～ 510 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

(C) 配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 1 ～ 519 で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ペプチドの N-末端からアミノ酸を遊離する反応を触媒する活性を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号 4 のアミノ酸番号 1 ～ 510 で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ペプチドの N-末端からアミノ酸を遊離する反応を

触媒する活性を有するタンパク質。

【請求項 3】 下記 (a) ~ (d) のいずれかに示す DNA である請求項 2 記載の核酸分子。

(a) 配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 72 ~ 1628 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 73 ~ 1602 からなる塩基配列を含む DNA。

(c) 前記 (a) の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペプチドの N-末端からアミノ酸を遊離する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする DNA。

(d) 前記 (b) の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペプチドの N-末端からアミノ酸を遊離する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 4】 配列番号 2 又は配列番号 4 に示す塩基配列を有する請求項 3 記載の核酸分子。

【請求項 5】 請求項 2 記載の核酸分子を含む組換え核酸分子。

【請求項 6】 請求項 2 記載の核酸分子が発現可能な形態で導入された形質転換微生物宿主。

【請求項 7】 糸状菌又は酵母又はエシェリヒア属細菌である請求項 6 記載の形質転換微生物宿主。

【請求項 8】 請求項 7 記載の形質転換微生物宿主を培地で培養し、請求項 7 に記載の形質転換微生物宿主に導入された核酸分子を発現させ、産生されたタンパク質を回収することを特徴とするアミノペプチダーゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アミノペプチダーゼ及びそれをコードする遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】

醤油、味噌、その他の蛋白加水分解物を含む天然調味料の製造に、麹菌が利用されている。たとえば、醤油は、製麹および発酵の2段階を経て製造される。主として、製麹段階において、麹菌（アスペルギルス（*Aspergillus*）属糸状菌）が生産する酵素によって原料が分解される。その際、醤油中の呈味性をよくするためには、諸味中の遊離アミノ酸の量を増加させることが重要である。

アミノ酸は、原料タンパク質から2つの段階を経て生成される。第一は、プロテアーゼによるタンパク質からのペプチドの放出であり、第二はペプチダーゼによって触媒されるペプチドの加水分解によるアミノ酸の生成である。

醤油製造において遊離アミノ酸を増加させるにはロイシンアミノペプチダーゼと酸性カルボキシペプチダーゼの重要性が示されている（中代忠信、醤研 Vol. 11, No.2, (1985)）。しかしながら、醤油中にはジペプチド、トリペプチドが数多く残存し、難分解性ペプチドの存在が指摘されている。ペプチドの難分解性とは、分解反応を触媒する酵素、すなわちペプチダーゼの基質特異性がそのペプチドに対して低いことを意味する。醤油中の難分解性ペプチドとしては、グルタミン酸やアルパラギン酸またはグリシンやプロリンを含むジペプチドが報告されている（中台忠信、醤研 Vol.11、(1985)）。

麹菌のペプチダーゼについては、アスペルギルス・オリゼ（*Aspergillus oryzae*）やアスペルギルス・ソーヤ（*Aspergillus sojae*）由来のもの（JP 11346777、DE95-1952648、WO 9851163、WO 9628542、WO 9615504、WO 9851803、WO 9902705、WO 9814599）について報告されている。

### 【 0 0 0 3 】

一方、浅野らはダイズが、その発芽過程において、種子中の貯蔵タンパク質を非常に短時間にアミノ酸まで分解することに着目し、ダイズ子葉中よりペプチダーゼ類（酸性アミノ酸含有ペプチドを効率的に分解するアミノペプチダーゼGX、及びロイシンアミノペプチダーゼ群）を見出し、ダイズタンパク質の効率的な加水分解を行うことに成功した（特開平9-294583号）。

ダイズのアミノペプチダーゼGXはその酵素学的諸性質から、これまでに報告されていない新規なアミノペプチダーゼであり、発芽大豆以外にはその存在は知られていない。ダイズのアミノペプチダーゼGXはN末端にグルタミン酸などの

酸性アミノ酸を有するペプチドから、効率的にN末端の酸性アミノ酸を遊離する活性を有する。従って、本酵素の作用により、醤油中の難分解性ペプチドを効率的に分解することができ、グルタミン酸の遊離率が高く呈味性の優れた醤油の製造が可能である。

二宮らはダイズのアミノペプチダーゼGXを遺伝子組換え技術を用いて大量生産することに成功した（特開2000-325090）が、この方法により生産したダイズのアミノペプチダーゼGXを醤油醸造に利用することは、GMO問題、コスト面等で困難である。

#### 【0004】

ところで、麹菌はタンパク質を菌体外に分泌する能力に優れており、組換えタンパク質の生産の為に宿主として注目されており、いくつかの酵素で実用化されている。また、麹菌のペプチダーゼも一部研究されてきたが、醤油中の難分解性ペプチドを効率良く分解するペプチダーゼは報告されていない。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は醤油中の難分解性ペプチドを効率良く分解する麹菌由来のアミノペプチダーゼおよび該アミノペプチダーゼをコードする遺伝子を提供することを目的とする。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

本研究者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行い、ダイズ由来アミノペプチダーゼGX遺伝子と相同性のある、アスペルギルス・ニジュランス (*A. nidulans*) ESTをプローブに用いることにより、アスペルギルス・ニジュランスのゲノムDNAライブラリーをスクリーニングし、ダイズ由来アミノペプチダーゼGXと同様の基質特異性を有するアスペルギルス・ニジュランス由来アミノペプチダーゼをコードするDNAを取得することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は下記（A）～（D）のいずれかに示すタンパク質である。

（A）配列表の配列番号2のアミノ酸番号1～519で表されるアミノ酸配列を有



するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 4 のアミノ酸番号 1 ～510 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

(C) 配列表の配列番号 2 のアミノ酸番号 1 ～519 で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ペプチドの N-末端からアミノ酸を遊離する反応を触媒する活性を有するタンパク質。

(D) 配列表の配列番号 4 のアミノ酸番号 1 ～510 で表されるアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ペプチドの N-末端からアミノ酸を遊離する反応を触媒する活性を有するタンパク質。

#### 【0007】

また本発明は、上記の (A) ～ (D) のいずれかをコードする核酸分子、該核酸分子を含む組換え核酸分子、形質転換微生物宿主、および該形質転換微生物宿主を用いたアミノペプチダーゼの製造法である。

#### 【0008】

#### 【発明の実施の形態】

本発明は、上述したとおり、麴菌由来のアミノペプチダーゼおよび、それをコードする核酸分子である。本明細書においては、本発明の麴菌由来アミノペプチダーゼタンパク質を PepE と記載し、PepE をコードする遺伝子を pepE と記載することがある。また、本明細書において、「アミノペプチダーゼ」とは、ペプチドの N-末端から順次アミノ酸を遊離する反応を触媒する活性を有するタンパク質をいう。

本発明のアミノペプチダーゼをコードする核酸分子は、アスペルギルス・ニジュランスの染色体 DNA 又は cDNA から取得することができる。具体的には、アスペルギルス・ニジュランス、例えばアスペルギルス・ニジュランス A26 株の染色体 DNA ライブラリーから取得することができる。発芽大豆由来のアミノペプチダーゼ GX (特開 2000-325090) の遺伝子配列とアスペルギルス・ニジュランス EST データベース中の相同性の高い EST 断片の塩基配列を参考に、PCR (ポリメラーゼ・チェ

イン・リアクション) プライマーを作製し、アスペルギルス・ニジュランス染色体DNAライブラリーを鋳型としたPCR法により本発明の核酸分子を含むクローンを取得することができる。PCR用プライマーの例としては、配列番号6及び7に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。

## 【0009】

また、本発明の核酸分子は、アスペルギルス・ニジュランスのポリ(A) RNAから調製したcDNAライブラリーから、例えば配列番号8及び9に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCR、さらに配列番号10及び11に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとする5'-RACEによって、取得することができる。上記のようにして得られるアスペルギルス・ニジュランスA26由来のPepEをコードする遺伝子を含むゲノムDNAの塩基配列を配列番号1に示す。また、cDNAの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号2に、アミノ酸配列のみを配列番号3を示す。ゲノムDNAとcDNAの塩基配列を比較した結果、ゲノムDNA中にはイントロンは見出されなかった。

## 【0010】

本発明の核酸分子は、本発明のアミノペプチダーゼをコードするものであればよく、配列番号2に示す塩基配列のうち塩基番号72～1628からなる塩基配列を有するDNAの他、5'末端側の不要な部分を除いたものも含まれる。「核酸分子」にはDNA、RNAおよびこれらのアナログも含まれる。使用する目的によっては、成熟タンパク質のみをコードするものであってもよい。また、コード領域において各アミノ酸をコードするコドンと同じアミノ酸をコードする他の等価のコドンに置換したものも本発明の核酸分子に含まれる。さらに、本発明の核酸分子は、コードされるアミノペプチダーゼの活性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノペプチダーゼをコードするものであってもよい。ここで、「複数」とは、ペプチダーゼタンパク質の立体構造におけるアミノ酸残基の位置や種類によっても異なるが、通常2～300個、好ましくは2～170個、さらに好ましくは2～50個、最も好ましくは2～10個である。

上記のようなアミノペプチダーゼと実質的に同一のタンパク質をコードする核

酸分子は、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加されるようにpepEの塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変された核酸分子は、従来知られている突然変異処理によっても取得され得る。突然変異処理としては、PepEをコードするDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及びPepEをコードするDNAを保持するエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）もしくは亜硝酸等の通常人工突然変異に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

#### 【 0 0 1 1 】

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、麴菌の種あるいは菌株による差等、天然に生じる変異も含まれる。上記のような変異を有する核酸分子を、適当な細胞で発現させ、発現産物のPepE活性を調べることで、PepEと実質的に同一のタンパク質をコードする核酸分子が得られる。また、変異を有するPepEをコードする核酸分子またはこれを保持する細胞から、例えば配列表の配列番号2に記載の塩基配列のうち、塩基番号72～1628からなる塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、PepE活性を有するタンパク質をコードする核酸分子を単離することによっても、PepEタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードする核酸分子が得られる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成される条件をいう。この条件は個々の配列のGC含量や繰り返し配列の有無などに依存するため明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高い核酸分子同士、例えば65%以上の相同性を有する核酸分子同士がハイブリダイズし、それより相同性が低い核酸分子同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗滌条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれる可能性があるが、それらについては、市販の活性発現ベクターにつなぎPepE活性を後述の方法で測定することによって容易に取り

除くことができる。

#### 【 0 0 1 2 】

また、本発明の核酸分子は、アスペルギルス属の他の種に属する微生物、例えばアスペルギルス・オリゼの染色体DNA又はcDNAから取得することもできる。具体的には、アスペルギルス・オリゼ、例えばアスペルギルス・オリゼRIB40 (ATC C42149) のcDNAライブラリーからPCR法により取得することができる。上記アスペルギルス・ニジュランズのPepEの塩基配列をもとに、PCR用のオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、アスペルギルス・オリゼ、例えばアスペルギルス・オリゼRIB40の菌体より調製したcDNAライブラリーを鋳型とするPCRを行うことにより調製することができる。PCR用プライマーとしては、5'-RACE用には配列番号12及び13に示す塩基配列、3'-RACE用には配列番号14及び15に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。

上記のようにして得られるアスペルギルス・オリゼRIB40のpepEに対応する遺伝子cDNAの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号4に、アミノ酸配列のみを配列番号5に示す。配列番号2に示すアスペルギルス・ニジュランズのPepEのアミノ酸配列と配列番号4に示すアスペルギルス・オリゼの対応するアミノペプチダーゼのアミノ酸配列は、約77%の相同性を有しており、成熟タンパク質部分では約120アミノ酸残基が異なっている。アスペルギルス・オリゼのpepE対応遺伝子とアスペルギルス・ニジュランズのpepEとの相同性は、コード領域では約71%であった。

#### 【 0 0 1 3 】

本発明の一つの実施態様において、本発明の核酸分子は、配列表の配列番号4のアミノ酸番号1～510で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸からなり、かつ、ペプチドからアミノ酸を遊離する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする核酸分子を含む。また、本発明の別の実施態様では、本発明の核酸分子は、配列表の配列番号4に示す塩基配列のうち、塩基番号73～1602からなる塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペプチドからアミノ酸を遊離する反応を触媒する活性を有するタンパク質をコードする核

酸分子を含む。

本発明の核酸分子は、以下に示す実施例においては、上記のようにして得られたDNAである。その塩基配列が明らかとなったので、アスペルギルス・ニジュランス A26もしくはアスペルギルス・オリゼRIB40、又はアスペルギルス・ニジュランスもしくはアスペルギルス・オリゼの他の菌株のゲノムDNAから、PCR又はハイブリダイゼーション等により、これらの菌株から対応するアミノペプチダーゼをコードする核酸分子を容易にクローニングすることができる。従って、そのような核酸分子も本発明の範囲である。

#### 【 0 0 1 4 】

本発明の核酸分子は本発明のアミノペプチダーゼを製造するために使用することができる。

本発明の核酸分子は、麹菌等の糸状菌の育種、あるいはアミノペプチダーゼPepEの製造に利用することができる。例えば、本発明の一つの実施態様において、本発明のアミノペプチダーゼをコードするDNAを、糸状菌細胞内に好ましくはマルチコピーで導入することにより、PepE活性を増大させることができる。また、本発明の核酸分子を適当な宿主で発現させることにより、PepEを製造することができる。このようにして得られる麹菌等の糸状菌又はそれらより得られるPepEを、醤油、味噌、その他の蛋白加水分解物を含む調味料等の製造に利用することができる。

本発明の核酸分子を導入する糸状菌としては、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ニガー (*A. niger*)、アスペルギルス・ニジュランス等のアスペルギルス属、ニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) 等のニューロスボラ属、リゾムコール・ミーハイ (*Rhizomucor miehei*) 等のリゾムコール属に属する糸状菌が挙げられる。

#### 【 0 0 1 5 】

上記のような糸状菌に本発明の核酸分子を導入するためのベクターとしては特に制限されず、糸状菌の育種等に通常用いられているものを使用することができる。例えば、アスペルギルス・オリゼに用いられるものとしては、pUNG (Lee, B. R. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 44, 425-431 (1995))、pMARG (T

suchiya, K. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 327-332 (1993))、pUSC (Gomi, K. et al., Agric. Biol. Chem. 51, 2549-2555 (1987)) 等が挙げられる。pUNGはアスペルギルス・オリゼ niaD300 (Minetoki, T. et al., Curr. Genet. 30, 432-438 (1996)) のniaD<sup>-</sup> (硝酸資化能欠損) を相補するマーカーを、pMARGはアスペルギルス・オリゼ M2-3 (Gomi, K. et al., Agric. Biol. Chem., 51(9), 2549-2555 (1987)) のargB<sup>-</sup> (アルギニン要求) を相補するマーカーを、pUSCはアスペルギルス・オリゼ NS4 (Yamada, O. et al., Biosci. Biotech. Biochem., 61(8), 1367-1369 (1997)) のsC<sup>-</sup> (ATPスルフリラーゼ欠損) を相補するマーカーを、それぞれ有している。

## 【 0 0 1 6 】

これらのベクターのうち、pUNG及びpMARGは、グルコアミラーゼ遺伝子 (glaA) のプロモーター及び $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 (amyBのターミネーター) を有しており、該プロモーターの下流に本発明のDNA (例えば配列番号2において塩基番号72~1628を含む領域) をフレームを合わせて挿入することにより、該プロモーター制御下でPepEを発現させることができる。また、pUSCはプロモーターを含んでいないので、これを用いる場合は、本発明のDNAを挿入したpUC19等のプラスミドとpUSCとの共形質転換 (co-transformation) により宿主糸状菌に導入することによってPepEを発現させることができる。

## 【 0 0 1 7 】

また、以下の文献に記載されているベクター、プロモーター及びマーカーも宿主糸状菌に応じて使用することができる。表1中、プロモーターは天然にその制御下にある遺伝子がコードする酵素名で示してある。

【表 1】

表 1.

文献	プロモーター	マーカー	宿主系状菌
特表平 4-503450 号	中性 $\alpha$ -アミラーゼ		アスペルギルス・ニコター
		argB	アスペルギルス・ニコター
		argB	アスペルギルス・ニジェランス
		trpC	アスペルギルス・ニジェランス
		amdS	アスペルギルス・ニジェランス
		pyr4	ニューロスボラ・クラッサ
		DHFR	ニューロスボラ・クラッサ
特開昭 62-272988	タカアミラーゼ		アスペルギルス・オリゼ
	アスパラギン酸プロテアーゼ		リゾムコール・ミーハイ
	リパーゼ		リゾムコール・ミーハイ
	グルコアミラーゼ、リパーゼ		アスペルギルス・ニコター
	アミラーゼ、グルコアミラーゼ、セルラーゼ		
	プロテアーゼ、解糖系酵素		
特開平 7-51067	タカアミラーゼ		アスペルギルス属
特開平 7-115976	新規プロモーター配列が記載		アスペルギルス・オリゼ
特開平 7-59571	新規プロモーター配列が記載		アスペルギルス・オリゼ
日本農芸学会誌	$\alpha$ -アミラーゼ (anyB)		アスペルギルス・オリゼ
Vol.71, No.10(1997)	グルコアミラーゼ (glaA)		アスペルギルス・オリゼ
1018-1023	グルコシダーゼ (agdA)		アスペルギルス・オリゼ

## 【0018】

糸状菌の形質転換は、上記文献に記載されている方法の他、任意の公知の方法を採用することができる。例えばアスペルギルス・オリゼは以下のようにして形質転換することができる。

DPY培地（グルコース 2 %、ペプトン 1 %、酵母エキス 0.5 %、pH5.0）に菌体

(分生子)を植菌し、30℃で24時間程度激しく振盪培養する。培養液をミラクロス(Myra cloth、CALBIO CHEM社製)又は滅菌したガーゼ等で濾過し、菌体を回収し、滅菌水で洗浄し、水分をよく切る。この菌体を、試験管に入れ、酵素液(1.0%ヤタラーゼ(Yatalase、宝酒造(株)製)、または0.5%ノボザイム(NovoZyme、ノボノルディスク社製)及び0.5%セルラーゼ(例えばCellulase Onozuka、ヤクルト社製)、0.6M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、50mM リンゴ酸、pH5.5)を加え、30℃で3時間程度穏やかに振盪する。顕微鏡でプロトプラスト化の程度を観察し、良好であれば氷中に保存する。

## 【 0 0 1 9 】

上記酵素反応液をミラクロスで濾過して菌体残渣を除去し、プロトプラストを含む濾液に等量の緩衝液A(1.2Mソルビトール、50mM  $\text{CaCl}_2$ 、35mM  $\text{NaCl}$ 、10mM Tris-HCl、pH7.5)を加えて氷中に置く。これを0℃、2,500rpmで8分遠心した後、緩やかに停止させ、ペレットを緩衝液Aで洗浄し、適量の緩衝液Aに懸濁する。100~200 $\mu\text{l}$ のプロトプラスト懸濁液に20 $\mu\text{l}$ 以下のDNA溶液(5~10 $\mu\text{g}$ )を加え、20~30分氷中に置く。緩衝液B(ポリエチレングリコール6000、50mM  $\text{CaCl}_2$ 、10mM Tris-HCl、pH7.5)を250 $\mu\text{l}$ 加えて穏やかに混合し、再び緩衝液Bを250 $\mu\text{l}$ 加えて穏やかに混合した後、さらに緩衝液Bを850 $\mu\text{l}$ 加えて穏やかに混合し、20分室温で静置する。その後、10mlの緩衝液Aを加えて試験管を反転させ、0℃、2,000rpmで8分遠心し、ペレットを500 $\mu\text{l}$ の緩衝液Aに懸濁する。

上記懸濁液の適量を、予め分注し保温しておいた5mlのトップアガーに加えて、下層培地(1.2Mソルビトールを含有し、マーカーに応じて調製した選択培地)に重層し、30℃で培養する。生育した菌体を選択培地に植え継いで、形質転換体であることを確認する。さらに、菌体から組換えDNAを調製し、制限酵素解析又はサザン解析等によって、本発明のDNAが導入されていることを確認しておくことが好ましい。

## 【 0 0 2 0 】

上記のようにして得られる形質転換体を、使用するプロモーターに適した条件で培養することによってpepEが発現し、PepEが得られる。

得られたPepEは更に塩析、等電点沈殿、ゲル濾過、イオンクロマトグラフィー



、逆相クロマトグラフィー等によって精製して、タンパク質の分解のために使用することができる。しかしながら、本発明の核酸分子を導入しPepE活性の向上した形質転換微生物の培養物をタンパク質分解酵素とともにタンパク質原料と直接混合してタンパク質またはその混合物に作用させることにより、グルタミン酸ナトリウム含有量が高く、うま味の強い蛋白加水分解物を得ることもできる。作用させるタンパク質原料としては、例えば大豆、小麦、小麦グルテン等が挙げられ、さらに脱脂大豆あるいは膨化や可溶化等の加工をされた種々のタンパク質あるいはこれらの種々の原料からの分離タンパク質であってもよい。

形質転換微生物の培養物をタンパク質に作用させる条件としては、たとえば0.2～50%濃度のタンパク質原料に形質転換微生物の培養物をタンパク質分解酵素存在下で混合し、5～60℃にて4時間～10日間反応させればよい。

反応終了後、未反応のタンパク質原料、菌体などの不溶物は遠心分離や濾過等、従来の分離法を用いて除去すればよい。また、必要に応じて減圧濃縮、逆浸透法などにより濃縮を行い、濃縮物は、凍結乾燥、減圧乾燥、噴霧乾燥等の乾燥処理により粉末化または顆粒化することもできる。かくして外部からグルタミン酸ナトリウムを添加することなく、グルタミン酸ナトリウム含有量が高く、呈味性の強い蛋白加水分解物を得ることができる。

#### 【0021】

##### 【実施例】

##### 実施例1. アスペルギルス・ニジュランズのpepEゲノムDNAのクローニング

発芽大豆由来のアミノペプチダーゼGXの配列をもとに、アスペルギルス・ニジュランズのESTデータベース(<http://www.genome.ou.edu/fungal.html>)を用いて、ホモロジー検索したところ、相同性の高いEST obd03a1.f1を見出した。

この情報を下に、アスペルギルス・ニジュランズ ゲノムライブラリーからアスペルギルス・ニジュランズpepEのクローニングを以下のように行なった。

#### 【0022】

アスペルギルス・ニジュランズ ゲノムライブラリーはFungal Genetics Stock Center (Kansas City, USA)より購入した。本ライブラリーはアスペルギルス・ニジュランズのゲノムDNAを制限酵素で切断した後、コスミドベクターに連結

させ、エシェリヒア・コリに導入したものである。ライブラリーのスクリーニングは以下のようにおこなった。即ち、コスミドベクターを含む大腸菌を鋳型DNA源として、EST obd03a1.f1の塩基配列に基づいて合成した下記の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーに用いたPCRにより、目的遺伝子が含まれる大腸菌クローンをスクリーニングした。

(5' 末端用プライマー)

CTC AAA CGG CCA CAT GAC TAC (配列番号6)

(3' 末端用プライマー)

GTC TGT TCA AGT GCA TAG CCT G (配列番号7)

<配列表フリーテキスト>

配列番号6, 7: PCRプライマー

【0023】

PCR反応は、94℃ 3分間の熱変性後、94℃ 30秒、52℃ 10秒、72℃ 30秒の反応を25サイクルで行なった。その結果、4個のクローンに目的遺伝子が含まれることが明らかとなった。これらのクローンよりコスミドベクターを回収し、塩基配列を決定した。本塩基配列およびこの塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を配列番号2に、アミノ酸配列のみを配列番号3に示す。

本遺伝子をプラスミドpUC19に挿入して得られたプラスミドで形質転換されたエシェリヒア・コリJM109株は、プライベートナンバーAJ13856が付され2001年3月19日に経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に寄託され、受託番号FERM P-18263が付与されている。

【0024】

実施例2. アスペルギルス・ニジュランズのpepE cDNAのクローニング

アスペルギルス・ニジュランズA26をYG培地(酵母エキストラクト 0.5%, グルコース 2.5%, 微量元素\* 0.1%, pH 6.5) 50mlで30℃、48時間振とう培養した(\*: 微量元素: FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1%, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.88%, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.04%, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.015%, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 0.01%, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MoO<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.005%)。

菌体を回収し、液体窒素にて凍結後、乳鉢を用いて粉碎した。粉碎物より、RN easy Plant Mini Kit (QIAGEN社)を用いて全RNAの調製を行ない、Micro FAST

Track Kit (Invitrogen社) を用いて mRNA の調製を行なった。この mRNA から、cDNA synthesis kit (Promega社) を用い cDNA を合成し、cDNA PCR Library Kit (TaKaRa社) を用いて、cDNA ライブラリーの作製を行った。

cDNA ライブラリーを鋳型として、アスペルギルス・ニジュランスゲノム DNA 配列よりデザインした下記配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーに用いた PCR および 5' -RACE により、pepE cDNA のクローニングを行った。

## 【 0 0 2 5 】

( 5' 末端用プライマー )

CAC CAC CAT GAG TCT AAC TTG G ( 配列番号 8 )

( 3' 末端用プライマー )

GTC TGT TCA AGT GCA TAG CCT G ( 配列番号 9 )

( 5' -RACE 用 5' 末端用 プライマー )

CGT GGT ACC ATG GTC TAG AGT ( 配列番号 1 0 )

( 5' -RACE 用 3' 末端用プライマー )

AAT CGC AGT AAG CCT GCG AG ( 配列番号 1 1 )

< 配列表フリーテキスト >

配列番号 8 ～ 1 1 : PCR プライマー

## 【 0 0 2 6 】

PCR の反応条件は、94℃ 9 分間の熱変性の後、94℃ 30 秒、55℃ 30 秒、72℃ 30 秒の反応を 30 サイクル行い、さらに 72℃ 5 分の反応を行った。その結果、配列番号 8 及び 9 のプライマーを用いた PCR により約 1800bp の DNA 断片が、配列番号 1 0 及び 1 1 のプライマーを用いた 5' -RACE により約 250 bp の増幅断片が得られた。これらの DNA 断片の塩基配列および塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

上記アスペルギルス・ニジュランス pepE cDNA 断片を、pBluescript に挿入して得られたプラスミドで形質転換されたエシェリヒア・コリ JM109 株は、プライベートナンバー AJ13857 が付され、2001 年 3 月 19 日に経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に寄託され、受託番号 FERM P-18264 が付与されている。

【 0 0 2 7 】

実施例 3. アスペルギルス・オリゼのpepE相同cDNAのクローニング

( 1 ) アスペルギルス・オリゼcDNAライブラリーの構築

アスペルギルス・オリゼRIB40 (ATCC42149) を、DPY培地50mlで30℃、64時間培養した。菌体をろ過により集め、1 gを回収した。この菌体を直ちに液体窒素で凍結し、乳鉢で粉砕した後、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社) にて全RNAを得た。このRNAからmRNA Purification Kit (Pharmacia社)を用いてmRNAを精製し、cDNA PCR library kit (Takara社)または3'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (GIBCO BRL)により、cDNAライブラリーを構築した。

【 0 0 2 8 】

( 2 ) アスペルギルス・オリゼcDNAライブラリーのスクリーニング

実施例 2 で得たアスペルギルス・ニジュランズのPepE配列を参考に、配列番号 1 2 及び 1 3 で示したオリゴヌクレオチドをプライマーに用いた5'-RACEおよび配列番号 1 4 及び 1 5 を用いた3'-RACEによって、アスペルギルス・オリゼのpepEに相同なcDNAのクローニングを行った。

( 5' -RACE用 5' 末端プライマー )

CGT GGT ACC ATG GTC TAG AGT (配列番号 1 2)

( 5' -RACE用 3' 末端用プライマー )

CAT GGG CCC AAT GGT TCC GC (配列番号 1 3)

( 3' -RACE用 5' 末端プライマー )

CCA GAT TCG TAA TGA CTC CCG (配列番号 1 4)

( 3' -RACE用 3' 末端プライマー )

CTA CTA CTA CTA GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC (配列番号 1 5)

<配列表フリーテキスト>

配列番号 1 2 ~ 1 5 : PCRプライマー

【 0 0 2 9 】

5' RACEのPCR反応は、95℃で9分熱変性した後、94℃ 30秒、53℃ 30秒、72℃ 1分の反応を35サイクル行った。これにより約1400bpのアスペルギルス・オリゼpepE断片を得た。3' RACEのPCR反応は、95℃で9分熱変性した後、94℃ 30

秒、60℃ 30秒、72℃ 1 分の反応を35サイクル行った。これにより約300bのアスペルギルス・オリゼのpepE相同遺伝子断片を得た。

上記遺伝子断片の塩基配列を決定したところ、配列番号4に記載の全長pepE相同配列を含むことが明らかとなった。本塩基配列およびこの塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を配列番号4に示す。また、アミノ酸配列のみを配列番号5に示す。

本遺伝子をプラスミドpBluescriptに挿入して得られたプラスミドで形質転換されたエシェリヒア・コリDH5 $\alpha$ 株は、プライベートナンバーAJ13858が付され、2001年3月19日に経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所に寄託され、受託番号FERM P-18265が付与されている。

【0030】

【発明の効果】

本発明により、グルタミン酸ナトリウム含有量が高く、うま味の強い蛋白加水分解物を得る手段が提供される。特に、本発明により醤油中の難分解性ペプチドを効率良く分解するアミノペプチダーゼおよびこれをコードする核酸分子が提供され、これによって醤油の呈味性を更に高めることが可能となる。

本発明の核酸分子を発現可能な形態で導入された宿主は、本発明のタンパク質を産生するために利用することが可能となる。

【0031】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> A new aminopeptidase and the gene encoding the peptidase

<130> Y1I0188

<140>

<141>

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3383

<212> DNA

<213> *Aspergillus nidulans*

<400> 1

```

gggagaagtg tcgcaggatc gagtgtttgt cagtgtgctg gtcacggagc cgagccaggt 60
gcatattcag attgggcctg cagcatctag agtcttgatt gcaaaggagt ccggagtaaa 120
tcactattcc gtgcctttcg acggacattc agggccggtg aggattgcga ttgtccgaca 180
tggtagagaa gttaagaccg caacagggcc tgctataacg gaagagtgca cggacggtaa 240
agtaaattgg aatgcatttg taggatcaag ttaatcgata taaaattgta ctagacacta 300
aaagcgttgg gataaatggt atctagataa cttgtatgat gtttgcaata tcggggcctg 360
ttatcgccag gcccggcctc ccagccactg ataagcgtca ctctcagtt ctccgcatga 420
ccgcatcttc cttcgctctt ctccaactct cctctctgtc gatgtcctct tcaccatctc 480
tcttgtttcc atatccttag cttttctatt gcatttttat ttatcttttg aatatggcca 540
agaaaaattct gtctgacatc caccaccatg agtctaactt ggcttaccgc cagtatgcc 600
agctgcctga aaccctccac ctcaactacc agcctcctac tgctactgca acccccgcg 660
cacacaccag cccgatccca gaggcaatca accccgacga ttactcgag gcttactgcg 720
attttatgac tgagcatccc accatttttc acgcagtcca tggcttctct aagcaactcg 780
aaagcaaggg atacaagtac ctatccgagc gggaattatg gacgccgcag ctcaaacgcg 840
gaggaaagta ctatacgact cgcaatggaa gctcgttgat tgcgttctct gtcggccccg 900
agtataagag tgggaatggc ctcgctatca tcgccggcca cattgatgcc ctacggcgca 960
agctcaagcc cgtctcaaaa ctcccgaata aagctggata cattcagatg ggagttgctc 1020

```

cttatgccgg cggctctgggc aagacatggt gggaccgtga tttgtctatc ggccgggaagg 1080  
 ttctcgttcg taacgctagc accggcaagg ttgaatccaa gctagtcaag ttgaactggc 1140  
 cgattgctcg catcccaacg ctagccgaac actttggcgc tccttcgcag gggccattca 1200  
 acaaggaaac acagatggta cctatcattg gagtcgacaa ctctgatctt ttccagtcta 1260  
 ccactccagc ggacagacgag ggcatcgaac ccggcacctt tgcctctacg cagcccccaa 1320  
 aactcatcaa agtgatctcc aaggaacttg gaatcacaaa ctacagcagc attctcagct 1380  
 gggagctaga actttatgac agccagcctg cacgtatcgg cggatttgac aaggatttta 1440  
 tcttcgccgg ccgcatcgat gacaagctct gctgctacgc cgcacaggaa gccctcatgg 1500  
 ctacctcca ccacacctct ccctcttcca tcaagatggt cggttacttt gatgatgagg 1560  
 aaattggtag cttgctccgt cagggtgccc gctccaactt catgtctagc gtcacgaac 1620  
 gcattgcaca atcctttgca acatcatatg gacccgatct ccttgcccaa accgttgcaa 1680  
 agagcttctt tatctcttct gatgtcatcc acgtgtcaa tcccaacttc ttgaatgtct 1740  
 atctcgagaa ccacgcgcct cgtctcaatg tcggcgtctc cgtctccgca gactcaaacg 1800  
 gccacatgac taccgacagt gtcagctacg gcttcatcaa gcgcgttgct gaaaagtgcg 1860  
 gctctcagct gcaggctttt caaatccgaa atgactcccg aagcggcgga accattgggc 1920  
 ccatgaccag ctcgcggatt ggaatgaggg ccattgatgt cggtatccca cagttgagca 1980  
 tgcatagcat tcgcgccacc acaggagatc gcgatcctgg gctgggtgtc aagctgttta 2040  
 aggggttctt tgattacttt gaagaggtgg atcgtgagtt ttctgatttt taggttgtga 2100  
 ctcttgtttt ctgtcgaggg gtgctgtcgc gctgcttggc cgtgtctagt ttggtttgca 2160  
 tgattttggt gctagggttg aagtgccttg gcattaagaa cctcatttag aatggtgact 2220  
 tctttgtata cgggggttcgg agtccgtcta tagaggcatg tgtaaggata aaaatcgaat 2280  
 cctacataat tccaggctat gcacttgaac agacaacatc tagattctag gcacgtcaaa 2340  
 ccatacaata tattaagagg cttccgtcta tttgatgctc caccggcac gaatctcaac 2400  
 agtaagcccc gtagtctact ccgtacttct tgcctgccga aggagaggat ggagatgagg 2460  
 gtgacgaatg cgttgttttc accagtcccc caatgacagt tgcattatcc tcaatttaat 2520  
 cagccccgtc tccttcagc tccacccag cctttggagc agtccgggca atgctctctg 2580  
 cgacacttac tgtcatgac ccctacata aacacacggc ttcgcagccc cagccccagc 2640  
 cccattcagg gccaaaagct ctagactgat ccgcatccca ctcaaacctc ccatgttcca 2700  
 aatcattgat gtgcgttggt attgtagtag aaatgcccat tccccaatg ctccagaaaa 2760

ctggcggccg gggttcttgc ccaactgtaa gcgctaggct ccgagataat ctcttagact 2820  
 tggatttcga tctggatctg gggttgctgt gcgatgagag gagttgtgga atcatacggg 2880  
 aaagcagggg ccgcagagtc ggtaggcagg cgagactat gccgacgttg cattccactg 2940  
 cggaccaggt tgcggcaccg acgttgtcat ctgcttgctg ttagtagggg ttttttggg 3000  
 ttgatggagg gacgtacagg ttgggtccga agagtcagcg attcttttta gggacatcaa 3060  
 acggcaaattg cttgttatgc agacgctaga attactcagg attagcagat gcacacaccg 3120  
 accatggaac agaaaacgta caaaccccc accgcaaaaa ttgcaataag agcaactctc 3180  
 tgcttccttg gcaaatcaag actatacaag gcaggtatag ggataactag gatagcaagg 3240  
 tccgtcgcaa tatgcattga agcattggag aaccacagag cttcgaact gagacatgat 3300  
 cccgggattg ttgggtccca gaaacgtgct actggtatgc agttcaagaa cccgctaagc 3360  
 acagcccatg tgccgattga cga 3383

<210> 2

<211> 1916

<212> DNA

<213> *Aspergillus nidulans*

<220>

<221> CDS

<222> (72)..(1628)

<400> 2

tgctctcttc accatctctc ttgtttccat atccttagcc tttctattgc atttttattt 60

atcttttgaa t atg gcc aag aaa att ctg tct gac atc cac cac cat gag 110

Met Ala Lys Lys Ile Leu Ser Asp Ile His His His Glu

1

5

10



tct aac ttg gct tac cgc cag tat gcc cag ctg cct gaa acc ctc cac 158

Ser Asn Leu Ala Tyr Arg Gln Tyr Ala Gln Leu Pro Glu Thr Leu His

15

20

25

ctc aac tac cag cct cct act gct act gca acc ccc gcc gca cac acc 206

Leu Asn Tyr Gln Pro Pro Thr Ala Thr Ala Thr Pro Ala Ala His Thr

30

35

40

45

agc ccg atc cca gag gca atc aac ccc gac gat tac tcg cag gct tac 254

Ser Pro Ile Pro Glu Ala Ile Asn Pro Asp Asp Tyr Ser Gln Ala Tyr

50

55

60

tgc gat ttt atg act gag cat ccc acc att ttt cac gca gtc gat ggc 302

Cys Asp Phe Met Thr Glu His Pro Thr Ile Phe His Ala Val Asp Gly

65

70

75

ttc tct aag caa ctc gaa agc aag gga tac aag tac cta tcc gag cgg 350

Phe Ser Lys Gln Leu Glu Ser Lys Gly Tyr Lys Tyr Leu Ser Glu Arg

80

85

90

gaa tta tgg acg ccg cag ctc aaa cgc gga gga aag tac tat acg act 398

Glu Leu Trp Thr Pro Gln Leu Lys Arg Gly Gly Lys Tyr Tyr Thr Thr

95

100

105

cgc aat gga agc tcg ttg att gcg ttc tct gtc ggc ccc gag tat aag 446

Arg Asn Gly Ser Ser Leu Ile Ala Phe Ser Val Gly Pro Glu Tyr Lys

110

115

120

125

agt ggg aat ggc ctc gct atc atc gcc ggc cac att gat gcc ctc acg 494

Ser Gly Asn Gly Leu Ala Ile Ile Ala Gly His Ile Asp Ala Leu Thr

130

135

140

gcg aag ctc aag ccc gtc tca aaa ctt ccc aat aaa gct gga tac att 542

Ala Lys Leu Lys Pro Val Ser Lys Leu Pro Asn Lys Ala Gly Tyr Ile

145

150

155

cag atg gga gtt gct cct tat gcc ggc ggt ctg ggc aag aca tgg tgg 590

Gln Met Gly Val Ala Pro Tyr Ala Gly Gly Leu Gly Lys Thr Trp Trp

160

165

170

gac cgt gat ttg tct atc ggc ggg aag gtt ctc gtt cgt aac gct agc 638

Asp Arg Asp Leu Ser Ile Gly Gly Lys Val Leu Val Arg Asn Ala Ser

175

180

185

acc ggc aag gtt gaa tcc aag cta gtc aag ttg aac tgg ccg att gct 686

Thr Gly Lys Val Glu Ser Lys Leu Val Lys Leu Asn Trp Pro Ile Ala

190

195

200

205

cgc atc cca acg cta gcc gaa cac ttt ggc gct cct tcg cag ggg cca 734

Arg Ile Pro Thr Leu Ala Glu His Phe Gly Ala Pro Ser Gln Gly Pro

210

215

220

ttc aac aag gaa aca cag atg gta cct atc att gga gtc gac aac tct 782

Phe Asn Lys Glu Thr Gln Met Val Pro Ile Ile Gly Val Asp Asn Ser

225

230

235

gat ctt ttc cag tct acc act cca gcg gca gac gag ggc atc gaa ccc 830

Asp Leu Phe Gln Ser Thr Thr Pro Ala Ala Asp Glu Gly Ile Glu Pro

240	245	250	
ggc acc ttt gcc tct acg cag ccc cca aaa ctc atc aaa gtg atc tcc 878			
Gly Thr Phe Ala Ser Thr Gln Pro Pro Lys Leu Ile Lys Val Ile Ser			
255	260	265	
aag gaa ctt gga atc aca aac tac agc agc att ctc agc tgg gag cta 926			
Lys Glu Leu Gly Ile Thr Asn Tyr Ser Ser Ile Leu Ser Trp Glu Leu			
270	275	280	285
gaa ctt tat gac agc cag cct gca cgt atc ggc ggt att gac aag gat 974			
Glu Leu Tyr Asp Ser Gln Pro Ala Arg Ile Gly Gly Ile Asp Lys Asp			
290	295	300	
ttt atc ttc gcc ggc cgc atc gat gac aag ctc tgc tgc tac gcc gca 1022			
Phe Ile Phe Ala Gly Arg Ile Asp Asp Lys Leu Cys Cys Tyr Ala Ala			
305	310	315	
cag gaa gcc ctc atg gct acc tcc gac cac acc tct ccc tct tcc atc 1070			
Gln Glu Ala Leu Met Ala Thr Ser Asp His Thr Ser Pro Ser Ser Ile			
320	325	330	
aag atg gtc ggt tac ttt gat gat gag gaa att ggt agc ttg ctc cgt 1118			
Lys Met Val Gly Tyr Phe Asp Asp Glu Glu Ile Gly Ser Leu Leu Arg			
335	340	345	
cag ggt gcc cgc tcc aac ttc atg tct agc gtc atc gaa cgc att gca 1166			
Gln Gly Ala Arg Ser Asn Phe Met Ser Ser Val Ile Glu Arg Ile Ala			
350	355	360	365

caa tcc ttt gca aca tca tat gga ccc gat ctc ctt gcc caa acc gtt 1214

Gln Ser Phe Ala Thr Ser Tyr Gly Pro Asp Leu Leu Ala Gln Thr Val

370

375

380

gca aag agc ttc ctt atc tct tct gat gtc atc cac gct gtc aat ccc 1262

Ala Lys Ser Phe Leu Ile Ser Ser Asp Val Ile His Ala Val Asn Pro

385

390

395

aac ttc ttg aat gtc tat ctc gag aac cac gcg cct cgt ctc aat gtc 1310

Asn Phe Leu Asn Val Tyr Leu Glu Asn His Ala Pro Arg Leu Asn Val

400

405

410

ggc gtc tcc gtc tcc gca gac tca aac ggc cac atg act acc gac agt 1358

Gly Val Ser Val Ser Ala Asp Ser Asn Gly His Met Thr Thr Asp Ser

415

420

425

gtc agc tac ggc ttc atc aag cgc gtt gct gaa aag tgc ggc tct cag 1406

Val Ser Tyr Gly Phe Ile Lys Arg Val Ala Glu Lys Cys Gly Ser Gln

430

435

440

445

ctg cag gtc ttt caa atc cga aat gac tcc cga agc ggc gga acc att 1454

Leu Gln Val Phe Gln Ile Arg Asn Asp Ser Arg Ser Gly Gly Thr Ile

450

455

460

ggg ccc atg acc agc tcg cgg att gga atg agg gcc att gat gtc ggt 1502

Gly Pro Met Thr Ser Ser Arg Ile Gly Met Arg Ala Ile Asp Val Gly

465

470

475

atc cca cag ttg agc atg cat agc att cgc gcc acc aca ggg agt cgc 1550  
Ile Pro Gln Leu Ser Met His Ser Ile Arg Ala Thr Thr Gly Ser Arg

480 485 490

gat cct ggg ctg ggt gtc aag ctg ttt aag ggg ttc ttt gat tac ttt 1598  
Asp Pro Gly Leu Gly Val Lys Leu Phe Lys Gly Phe Phe Asp Tyr Phe

495 500 505

gaa gag gtg gat cgt gag ttt tct gat ttt taggttgga ctctgtttt 1648  
Glu Glu Val Asp Arg Glu Phe Ser Asp Phe

510 515

ctgtcgaggg gtgctgtcgc gctgcttggc cgtgtctagt ttggtttgca tgattttggt 1708

gctagggttg aagtgcttgg gcattaagaa cctcatttag aatggtgact tctttgtata 1768

cggggttcgg agtccgtcta tagaggcatg tgtaaggata aaaatcgaat cctacataat 1828

tccaggctat gcacttgaac agacaacatc tagattctag gcacgtcaaa ccatacaata 1888

tattaagagg cttccgtcta tttgatgc 1916

<210> 3

<211> 519

<212> PRT

<213> *Aspergillus nidulans*

<400> 3

Met Ala Lys Lys Ile Leu Ser Asp Ile His His His Glu Ser Asn Leu  
1 5 10 15

Ala Tyr Arg Gln Tyr Ala Gln Leu Pro Glu Thr Leu His Leu Asn Tyr  
20 25 30

Gln Pro Pro Thr Ala Thr Ala Thr Pro Ala Ala His Thr Ser Pro Ile  
35 40 45

Pro Glu Ala Ile Asn Pro Asp Asp Tyr Ser Gln Ala Tyr Cys Asp Phe  
50 55 60

Met Thr Glu His Pro Thr Ile Phe His Ala Val Asp Gly Phe Ser Lys  
65 70 75 80

Gln Leu Glu Ser Lys Gly Tyr Lys Tyr Leu Ser Glu Arg Glu Leu Trp  
85 90 95

Thr Pro Gln Leu Lys Arg Gly Gly Lys Tyr Tyr Thr Thr Arg Asn Gly  
100 105 110

Ser Ser Leu Ile Ala Phe Ser Val Gly Pro Glu Tyr Lys Ser Gly Asn  
115 120 125

Gly Leu Ala Ile Ile Ala Gly His Ile Asp Ala Leu Thr Ala Lys Leu  
130 135 140

Lys Pro Val Ser Lys Leu Pro Asn Lys Ala Gly Tyr Ile Gln Met Gly  
145 150 155 160

Val Ala Pro Tyr Ala Gly Gly Leu Gly Lys Thr Trp Trp Asp Arg Asp  
165 170 175

Leu Ser Ile Gly Gly Lys Val Leu Val Arg Asn Ala Ser Thr Gly Lys  
180 185 190

Val Glu Ser Lys Leu Val Lys Leu Asn Trp Pro Ile Ala Arg Ile Pro  
195 200 205

Thr Leu Ala Glu His Phe Gly Ala Pro Ser Gln Gly Pro Phe Asn Lys  
210 215 220

Glu Thr Gln Met Val Pro Ile Ile Gly Val Asp Asn Ser Asp Leu Phe  
225 230 235 240

Gln Ser Thr Thr Pro Ala Ala Asp Glu Gly Ile Glu Pro Gly Thr Phe  
245 250 255

Ala Ser Thr Gln Pro Pro Lys Leu Ile Lys Val Ile Ser Lys Glu Leu  
260 265 270

Gly Ile Thr Asn Tyr Ser Ser Ile Leu Ser Trp Glu Leu Glu Leu Tyr  
275 280 285

Asp Ser Gln Pro Ala Arg Ile Gly Gly Ile Asp Lys Asp Phe Ile Phe  
290 295 300

Ala Gly Arg Ile Asp Asp Lys Leu Cys Cys Tyr Ala Ala Gln Glu Ala





Thr Ser Ser Arg Ile Gly Met Arg Ala Ile Asp Val Gly Ile Pro Gln  
465 470 475 480

Leu Ser Met His Ser Ile Arg Ala Thr Thr Gly Ser Arg Asp Pro Gly  
485 490 495

Leu Gly Val Lys Leu Phe Lys Gly Phe Phe Asp Tyr Phe Glu Glu Val  
500 505 510

Asp Arg Glu Phe Ser Asp Phe  
515

<210> 4

<211> 1679

<212> DNA

<213> *Aspergillus oryzae*

<220>

<221> CDS

<222> (73)..(1602)

<400> 4

caggcttaaa ccgcattccg acaagatatc tagcctttaa actaagaaat tttccaactc 60

ctagccttcg ac atg acc aaa agg agt gtc ctt gat ctc cgt gat tct gcc 111

Met Thr Lys Arg Ser Val Leu Asp Leu Arg Asp Ser Ala

1

5

10

25

45

60

75

90

105

125

gat gca ctc acc gcc aaa ttg aag ccc gtg tcc aag ctg ccc aac aag 495  
 Asp Ala Leu Thr Ala Lys Leu Lys Pro Val Ser Lys Leu Pro Asn Lys  
 130 135 140

gct ggc ttt tcc cag ctc gga gtt gcg ccc tac gca ggc gct ctg agt 543  
 Ala Gly Phe Ser Gln Leu Gly Val Ala Pro Tyr Ala Gly Ala Leu Ser  
 145 150 155

gac aca tgg tgg gac cgc gat ctc tca ata ggt ggc cgt gtt ctg gtc 591  
 Asp Thr Trp Trp Asp Arg Asp Leu Ser Ile Gly Gly Arg Val Leu Val  
 160 165 170

caa gac tcc aac acc ggg aaa gtc gag tcc aaa tta gtc aaa ttg gac 639  
 Gln Asp Ser Asn Thr Gly Lys Val Glu Ser Lys Leu Val Lys Leu Asp  
 175 180 185

tgg ccc att gct cgg atc cca acc ctg gca cct cat ttc ggg gct ccc 687  
 Trp Pro Ile Ala Arg Ile Pro Thr Leu Ala Pro His Phe Gly Ala Pro  
 190 195 200 205

tcg caa ggc ccc ttc aac aaa gag act cag atg gtg cct ata att ggc 735  
 Ser Gln Gly Pro Phe Asn Lys Glu Thr Gln Met Val Pro Ile Ile Gly  
 210 215 220

gtt gat aac tcc gat ctt ttc cag cag caa gcc cca tcc aag ata gat 783  
 Val Asp Asn Ser Asp Leu Phe Gln Gln Gln Ala Pro Ser Lys Ile Asp  
 225 230 235

caa gac aac ggg atc aaa cct ggt aca ttt gca gcc acg caa ccg gaa 831

Gln Asp Asn Gly Ile Lys Pro Gly Thr Phe Ala Ala Thr Gln Pro Glu	
240	245
	250
aag ctt gtc aaa gtc ata tcc aag gag ctt ggt atc aca gac tac agc	879
Lys Leu Val Lys Val Ile Ser Lys Glu Leu Gly Ile Thr Asp Tyr Ser	
255	260
	265
tcg att ata agc tgg gag ctg gag ctg tat gac agt caa cca gca caa	927
Ser Ile Ile Ser Trp Glu Leu Glu Leu Tyr Asp Ser Gln Pro Ala Gln	
270	275
	280
	285
gtt ggt ggc ctg gac aag gac ctg att ttt gct ggt cgc att gac gat	975
Val Gly Gly Leu Asp Lys Asp Leu Ile Phe Ala Gly Arg Ile Asp Asp	
290	295
	300
aag ctc tgc tgc tat gcc gct cag gaa gct ctg ctt gcc tca tcc gac	1023
Lys Leu Cys Cys Tyr Ala Ala Gln Glu Ala Leu Leu Ala Ser Ser Asp	
305	310
	315
agt act tca act agc tct atc aag atg gtc ggt atg ttt gat gac gag	1071
Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ile Lys Met Val Gly Met Phe Asp Asp Glu	
320	325
	330
gaa att gga agc ctg ctt cgc cag gga gct cga tcc aac ttc atg agc	1119
Glu Ile Gly Ser Leu Leu Arg Gln Gly Ala Arg Ser Asn Phe Met Ser	
335	340
	345
agt gtc ata gag cgt att acg gaa gcc ttc tca ccc aat tac ggt cct	1167
Ser Val Ile Glu Arg Ile Thr Glu Ala Phe Ser Pro Asn Tyr Gly Pro	

350	355	360	365
aac gtg ctg tct caa act gtg gcg aac agc ttc ttc gtg tct tcg gac 1215			
Asn Val Leu Ser Gln Thr Val Ala Asn Ser Phe Phe Val Ser Ser Asp			
	370	375	380
gtc atc cat gcg gtc aat ccg aac ttc ctt ggt gtc tat ctt gag aac 1263			
Val Ile His Ala Val Asn Pro Asn Phe Leu Gly Val Tyr Leu Glu Asn			
	385	390	395
cat gct ccc cgt ctg aac gtc ggt gtg gcc gtc tcg gct gac tct aac 1311			
His Ala Pro Arg Leu Asn Val Gly Val Ala Val Ser Ala Asp Ser Asn			
	400	405	410
ggc cat atg aca aca gac agt gtg agc tac gga ttc atc aag cgt gtc 1359			
Gly His Met Thr Thr Asp Ser Val Ser Tyr Gly Phe Ile Lys Arg Val			
	415	420	425
gct gat cga tgt ggc tcg acc ttg cag gtc ttc cag att cgt aat gac 1407			
Ala Asp Arg Cys Gly Ser Thr Leu Gln Val Phe Gln Ile Arg Asn Asp			
430	435	440	445
tcc cgt agt ggc ggg act att gga ccc atg acc agt tct cgc att ggc 1455			
Ser Arg Ser Gly Gly Thr Ile Gly Pro Met Thr Ser Ser Arg Ile Gly			
	450	455	460
atg agg gcc att gac gtg ggg atc ccg cag ttg agt atg cac agt atc 1503			
Met Arg Ala Ile Asp Val Gly Ile Pro Gln Leu Ser Met His Ser Ile			
	465	470	475

cgt gcg act acc ggt agt ttg gat ccg gga ttg ggt gtg aag ctg ttc 1551  
 Arg Ala Thr Thr Gly Ser Leu Asp Pro Gly Leu Gly Val Lys Leu Phe  
 480 485 490

aag ggc ttt ttc gac tat ttc gag gag gtg gac aag gaa ttt gca gat 1599  
 Lys Gly Phe Phe Asp Tyr Phe Glu Glu Val Asp Lys Glu Phe Ala Asp  
 495 500 505

ttc tgatgcgctc ctctggaata ctaggaaatg tttccatcga taagtatgca 1652  
 Phe  
 510

ctatctggga ttccgatgtt ggatctg 1679

<210> 5

<211> 510

<212> PRT

<213> *Aspergillus oryzae*

<400> 5

Met Thr Lys Arg Ser Val Leu Asp Leu Arg Asp Ser Ala Met Ala Tyr  
 1 5 10 15

Arg Leu Ser Ala Gln Leu Pro Glu Pro Ser Pro Ala Thr Ile Ala Thr  
 20 25 30

Pro Val Ala Arg Ser Gly Pro Phe Ala Pro Glu Asp Tyr Thr Lys Pro

35

40

45

Tyr Cys Glu Phe Met Thr Ala Asn Pro Thr Ile Phe His Ala Val Asp

50

55

60

Gly Phe Thr Arg Gln Leu Glu Ser Gln Gly Tyr Lys Arg Leu Pro Glu

65

70

75

80

Arg Glu Thr Trp Asn Ser Lys Leu Glu Lys Gly Gly Lys Tyr Tyr Val

85

90

95

Thr Arg Asn Gly Ser Ala Phe Ile Ser Phe Ser Ile Gly Arg Asp Tyr

100

105

110

Lys Ser Gly Asn Gly Met Ala Ile Val Ala Gly His Ile Asp Ala Leu

115

120

125

Thr Ala Lys Leu Lys Pro Val Ser Lys Leu Pro Asn Lys Ala Gly Phe

130

135

140

Ser Gln Leu Gly Val Ala Pro Tyr Ala Gly Ala Leu Ser Asp Thr Trp

145

150

155

160

Trp Asp Arg Asp Leu Ser Ile Gly Gly Arg Val Leu Val Gln Asp Ser

165

170

175

Asn Thr Gly Lys Val Glu Ser Lys Leu Val Lys Leu Asp Trp Pro Ile

180

185

190

Ala Arg Ile Pro Thr Leu Ala Pro His Phe Gly Ala Pro Ser Gln Gly

195

200

205

Pro Phe Asn Lys Glu Thr Gln Met Val Pro Ile Ile Gly Val Asp Asn

210

215

220

Ser Asp Leu Phe Gln Gln Gln Ala Pro Ser Lys Ile Asp Gln Asp Asn

225

230

235

240

Gly Ile Lys Pro Gly Thr Phe Ala Ala Thr Gln Pro Glu Lys Leu Val

245

250

255

Lys Val Ile Ser Lys Glu Leu Gly Ile Thr Asp Tyr Ser Ser Ile Ile

260

265

270

Ser Trp Glu Leu Glu Leu Tyr Asp Ser Gln Pro Ala Gln Val Gly Gly

275

280

285

Leu Asp Lys Asp Leu Ile Phe Ala Gly Arg Ile Asp Asp Lys Leu Cys

290

295

300

Cys Tyr Ala Ala Gln Glu Ala Leu Leu Ala Ser Ser Asp Ser Thr Ser

305

310

315

320

Thr Ser Ser Ile Lys Met Val Gly Met Phe Asp Asp Glu Glu Ile Gly

325

330

335

Ser Leu Leu Arg Gln Gly Ala Arg Ser Asn Phe Met Ser Ser Val Ile

340

345

350



Glu Arg Ile Thr Glu Ala Phe Ser Pro Asn Tyr Gly Pro Asn Val Leu  
355 360 365

Ser Gln Thr Val Ala Asn Ser Phe Phe Val Ser Ser Asp Val Ile His  
370 375 380

Ala Val Asn Pro Asn Phe Leu Gly Val Tyr Leu Glu Asn His Ala Pro  
385 390 395 400

Arg Leu Asn Val Gly Val Ala Val Ser Ala Asp Ser Asn Gly His Met  
405 410 415

Thr Thr Asp Ser Val Ser Tyr Gly Phe Ile Lys Arg Val Ala Asp Arg  
420 425 430

Cys Gly Ser Thr Leu Gln Val Phe Gln Ile Arg Asn Asp Ser Arg Ser  
435 440 445

Gly Gly Thr Ile Gly Pro Met Thr Ser Ser Arg Ile Gly Met Arg Ala  
450 455 460

Ile Asp Val Gly Ile Pro Gln Leu Ser Met His Ser Ile Arg Ala Thr  
465 470 475 480

Thr Gly Ser Leu Asp Pro Gly Leu Gly Val Lys Leu Phe Lys Gly Phe  
485 490 495

Phe Asp Tyr Phe Glu Glu Val Asp Lys Glu Phe Ala Asp Phe

500

505

510

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 6

ctcaaacggc cacatgacta c

21

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 7

gtctgttcaa gtgcatagcc tg

22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 8

caccaccatg agtctaactt gg

22

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

s <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 9

gtctgttcaa gtgcatagcc tg

22

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 10

cgtggtacca tggctctagag t

21

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 11

aatcgagta agcctgcgag

20

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 12

cgtggtacca tggctctagag t

21

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 13

catgggccca atggttccgc

20

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 14

ccagattcgt aatgactccc g

21

<210> 15

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 15

ctactactac taggccacgc gtcgactagt ac

32

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 難分解性ペプチドを効率良く分解する麹菌由来のアミノペプチダーゼおよび該アミノペプチダーゼをコードする遺伝子を提供すること。

【解決手段】 アスペルギルス・ニジュランス由来アミノペプチダーゼおよびこれをコードする核酸分子。特に、配列表の配列番号2のアミノ酸番号1～519で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質または、そのアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ペプチドのN-末端からアミノ酸を遊離する反応を触媒する活性を有するタンパク質、およびこれらをコードする核酸分子。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書  
【提出日】 平成13年 3月28日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
    【出願番号】 特願2001- 78930  
【補正をする者】  
    【識別番号】 000000066  
    【氏名又は名称】 味の素株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100059959  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 中村 稔  
【手続補正 1】  
    【補正対象書類名】 特許願  
    【補正対象項目名】 受託証  
    【補正方法】 追加  
    【補正の内容】  
        【提出物件の目録】  
            【物件名】 受託証 3





書式 7

(B)20100590046



受 託 証

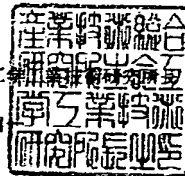
通知番号 : 13 生寄文 第 396 号

通知年月日: 平成 13 年 3 月 19 日

味の素株式会社  
代表取締役社長 江頭 邦雄 殿

産業技術総合研究所生命工

大 著 信



1. 微生物の表示	
<p>(寄託者が付した識別のための表示)</p> <p><i>Escherichia coli</i> AJ13856</p>	<p>(受託番号)</p> <p>FERM P- 18263</p>
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
<p>1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。</p> <p><input type="checkbox"/> 科学的性質</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置</p>	
3. 受領及び受託	
<p>当所は、平成 13 年 3 月 19 日に受領した 1 欄の微生物を受託する。</p>	



書式 7

受 託 証

通知番号 : 13 生寄文 第 397 号

通知年月日: 平成 13 年 3 月 19 日

味の素株式会社  
代表取締役社長 江頭 邦雄 殿

産業技術総合研究所生命工学

大箸 信



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示)  Escherichia coli AJ13857	(受託番号)  FERM P- 18264
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
<p>1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。</p> <p><input type="checkbox"/> 科学的性質</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置</p>	
3. 受領及び受託	
<p>当所は、平成 13 年 3 月 19 日に受領した 1 欄の微生物を受託する。</p>	



書式 7

受 託 証

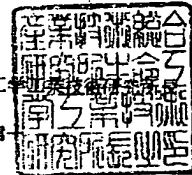
通知番号 : 13 生寄文 第 398 号

通知年月日 : 平成 13 年 3 月 19 日

味の素株式会社  
代表取締役社長 江頭 邦雄 殿

産業技術総合研究所生命工

大 署 信



1. 微生物の表示	
<p>(寄託者が付した識別のための表示)</p> <p><i>Escherichia coli</i> AJ13858</p>	<p>(受託番号)</p> <p>FERM P- 18265</p>
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
<p>1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。</p> <p><input type="checkbox"/> 科学的性質</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置</p>	
3. 受領及び受託	
<p>当所は、平成 13 年 3 月 19 日に受領した 1 欄の微生物を受託する。</p>	

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2001-078930
受付番号	20100590046
書類名	手続補正書
担当官	末武 実 1912
作成日	平成13年 5月10日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 受託証 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号

氏 名 味の素株式会社